注射大肠杆菌或超声波诱导家蚕及蓖麻蚕产生抗菌物质的比较研究*

屈贤铭　祁国荣　　　黄 自 然
（中国科学院上海生物化学研究所）（华南农学院蚕桑系）

摘要　本文报道：1. 蓖麻蚕 *Philosamia cynthia ricini*、家蚕 *Bombyx mori* 及柞蚕 *Antheraea pernyi* 注射大肠杆菌 *Escherichia coli* 或超声波处理均能诱导血淋巴产生抗菌物质。同一蚕种诱导产物相同，不同蚕种间差异明显。2. 家蚕不同发育阶段的个体诱导产生的抗菌物质基本相同；不同性别的家蚕蛹的诱导产物的相对量有差异；不同品种家蚕蛹对诱导的应答潜伏期也不尽相同。3. 注射聚肌胞核苷酸（Poly I:C）诱导家蚕血淋巴产生一种明显地不同于其它诱导源诱导的抗菌物质，此物质在酸性聚丙烯酰胺凝胶电泳中泳动速度较快。

本研究的所有结果均表明，诱导绢丝昆虫产生抗菌物质的诱导源是非专一性的，即诱导源与诱导产物之间无对应的关系。

关键词　家蚕　蓖麻蚕　抗菌物质　大肠杆菌　超声波

昆虫能适应环境而生存和发展，是有其独特的内在因素的。近年来，人们对昆虫的防御机理进行了广泛的研究，发现注射非病原细菌于蚕体或蚕蛹均能诱导产生溶菌酶和一类三十多个氨基酸残基的多肽或分子量约为 24,000 的抗菌物质——称抗菌多肽或抗菌蛋白（黄自然等，1981；周奇等，1983；钟文彪等，1982；大森和则等，1979；Hultmark 等，1982）。抗菌多肽的分子结构和性质已有详细报道（屈贤铭等，1982；大森和则等，1979；Hoffmann 等，1981；Powning 等，1973）。此外，对蚕蛹注射各种细胞结构的物质、不溶性粒子或可溶性化学物质以及物理刺激也能诱导蛹血淋巴产生一定量的抗菌物质（周奇等，1983）。在一定条件下，超声波亦能诱导柞蚕蛹产生抗菌多肽，并具有与细菌诱导相似的产物成分和活力水平（祁国荣等，1983）。本文报道不同品种的家蚕、家蚕蛹及蓖麻蚕蛹经不同诱导源的处理，将诱导产生的抗菌物质的特性进行比较。

材 料 和 方 法

一、材料　家蚕的幼虫和蛹，属二化性的原种有广农二号、广农三号、新九；杂交种有滇 13×滇 14**、苏 3·秋 3×苏 4***及东 34×苏 12；属多化性的原种有海南琼山及大造（具有滞育卵）等。蓖麻蚕为印黄品种。

二、诱导方法　超声波诱导方法见祁国荣等（1983）报道，具体使用的功率和时间见

本文于 1983 年 1 月收到。
* 本所江鹏、邱雪贞同志参加部分工作。
** 中国科学院昆明动物研究所涂光俦同志寄赠。
*** 中国农业科学院蚕业研究所胡雪芳、何家禄、吴冬秀同志提供。

本文结果;大肠杆菌诱导方法见屈贤铭等(1982)报道;聚肌胞核苷酸(Poly I:C)诱导方法见钟文彪等(1983)的报道,每头五龄蚕注射1—2微克/1—2微升*。

三、抗菌物质的分离及活性测定 抗菌物质的分离鉴别采用酸性聚丙酰胺凝胶电泳(PAGE)法(屈贤铭等,1982)。抗菌物质活性测定采用 Bomann 等(1981)的琼脂孔穴扩散法,接入抗链霉素的大肠杆菌突变种 D31 菌株,经一定时间孵育后测定抑菌圈的直径。

结 果 与 讨 论

一、超声波处理或注射细菌诱导家蚕、蓖麻蚕及柞蚕产生抗菌物质的比较

周奇等(1983)和祁国荣等(1983)报道了柞蚕滞育蛹经超声波处理或注射大肠杆菌能诱导血淋巴产生相同的抗菌物质,主要是抗菌多肽 D、E、Ps 和溶菌酶。同样,用超声波诱导家蚕蛹及蓖麻蚕蛹亦能诱导产生抗菌物质,超声波的功率为 75 瓦,频率为 20 仟赫兹,时间为 3—5 分钟。家蚕以滇 13×滇 14 的诱导效果较好,蓖麻蚕是印黄品种,见图 1。

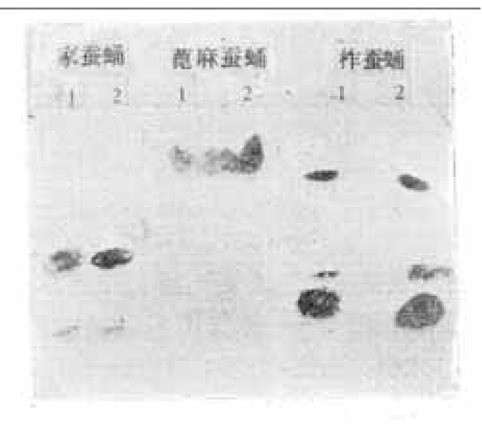


图 1 超声波处理和注射大肠杆菌诱导家蚕、蓖麻蚕及柞蚕蛹血淋巴中产生抗菌物质的聚丙烯酰胺凝胶电泳谱的比较。
1.注射大肠杆菌诱导 2.超声波诱导

比较三种不同种属的蚕蛹经过超声波处理或注射大肠杆菌后诱导血淋巴产生的抗菌物质的电泳行为,结果表明:同一种蚕蛹均诱导形成相同的抗菌物质,不同的种属中则有明显的差异。

Hoffmann 等(1981)对鳞翅目 4 个科的 8 种昆虫诱导形成的抗菌物质的电泳行为的研究,认为它们之间虽存在一定的区别,但与天蚕 *Hyalophora cecropia* 的抗菌多肽 P9A 及 P9B 相类似。从本试验的图谱中看到蓖麻蚕蛹的抗菌物质似只有一种组分。这与 Hoffmann 等(1981)报道的樗蚕 *Samia cynthia* 用热失活的绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa* 诱导的结果相似。可见蓖麻蚕与樗蚕的血缘是十分相近的,其诱导形成的抗菌物质的电泳谱亦基本相同。家蚕、蓖麻蚕及柞蚕系不同的昆虫种属,它们的抗菌物质电泳谱是截然不同的(图 1)。

二、注射细菌诱导不同发育阶段的家蚕产生相同的抗菌物质

用大肠杆菌注射于家蚕的四龄、五龄幼虫及蛹,经 3—4 天后分别取五龄幼虫、前期蛹及后期蛹的血淋巴测定其抗菌活性并比较它们在聚丙烯酰胺凝胶电泳的行为。结果均得到两种抗菌蛋白,我们称之为 M_1 及 M_2。与柞蚕的抗菌多肽 P9D 的电泳速度相比较,则 M_2 较快,M_1 较慢,见图 2。它们与大森等(1979)用 3% 福尔马林处理的大肠杆菌疫苗诱导家蚕五龄幼虫所得到的抗菌蛋白 S_1 及 S_2 可能相似。

不同家蚕品种之间细菌诱导形成的抗菌物质相对活性是不尽相同的;同一品种中雌雄性别间亦有某些差异,见图 3。广农三号品种雌雄蛹之间的差异比较明显,广农二号略有差异而新九品种则两性基本相同。不同品种间诱导抗菌活性的差异可能作为一个抗病

* 由本所娄艳春及刘新垣同志提供。

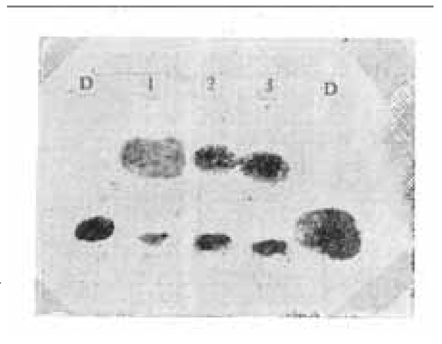


图 2　家蚕不同发育阶段注射大肠杆菌诱导血淋巴产生抗菌物质的比较

D.柞蚕杀菌肽 D
1.家蚕蛹
2.四龄蛹
3.五龄蛹
柞蚕品种：青黄 1 号；
家蚕品种为苏 3·秋 3×苏 4

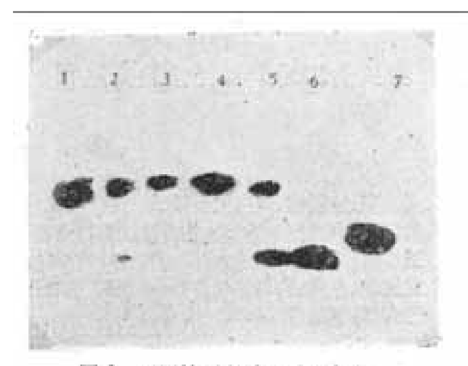


图 3　不同性别家蚕蛹诱导产生抗菌物质的比较

1.新九雌蛹
2.新九雄蛹
3.广三雌蛹
4.广三雄蛹
5.广二雌蛹
6.广二雄蛹
7.柞蚕杀菌肽 D

指标，可供选育抗病品种参考。

周奇等（1983）报道了柞蚕蛹血淋巴中抗菌物质的形成有一个诱导期，诱导期的长短与注射大肠杆菌的剂量有关。本试验在注射相同菌量的条件下，不同品种家蚕诱导形成抗菌物质时的诱导作用亦有差异。典型的多化性品种海南琼山的诱导期介于后两者之间。除品种差异外亦可能与单位体重注射的菌量有关。

三、聚肌胞核苷酸诱导家蚕产生新的抗菌活性物质

钟文彪等(1982)及刘新垣等(1981)报道 Poly I:C 注射于家蚕幼虫能提高其抑制细胞质多角体病毒（CPV）的能力。本试验进一步证实家蚕注射 PolyI:C 后能诱导血淋巴中产生抗菌活性物质，诱导期较细菌诱导者为短。将血淋巴作酸性聚丙烯酰胺凝胶电泳，发现产生两种新的抗菌物质，见图 4。它们都能抑制大肠杆菌生长。其中之一与细菌诱导产生的 M_1 相似，但另一抗菌物质(M_3)的泳动速度较快，这可能是碱性较强或分子量较少的多肽。这种抗菌物质的分离和提纯鉴定正在进行中。关于它对病毒抑制的可能性的研究将是很有意义的工作。



图 4　聚肌胞核苷酸（Poly I:C）与细菌诱导家蚕产生的抗菌物质比较

1.大肠杆菌诱导　2.正常家蚕血淋巴对照
3. Poly I:C 诱导

目前，在我们所有的实验结果表明：家蚕、蓖麻蚕及柞蚕血淋巴中产生的抗菌物质的

诱导源都是非专一性的，即诱导源与诱导产物之间无应答的特异关系，不存在特异性的免疫应答。我们认为这种特性是昆虫有别于哺乳动物免疫体系的独特的防御机能。

参 考 文 献

祁国荣、周 奇、屈贤铭、黄自然 1983 超声波诱导柞蚕蛹血淋巴产生抗菌物质。科学通报 **10**:622—5。

周 奇、黄自然、卢蕴良 1983 柞蚕蛹抗菌物质诱导源之研究。华南农学院学报 **4**(4): 1—7。

黄自然、王少颐 1981 注射大肠杆菌诱导柞蚕蛹血淋巴产生抗菌物质。华南农学院学报 **2**(1) :65—8。

钟文彪、黄自然、卢蕴良、刘新垣 1982 聚肌胞核苷酸及 2′，5′-寡腺苷酸诱导家蚕对细胞质多角体病毒抑制作用的研究。科学通报 **12**:219—24。

大森和则等，1979，無脊椎動物の生體防御機構，第3報，死ワテチン投与後蚕體液中に產生され る抗菌物质の特性及び生物活性。日本细菌學雜誌 **34**(1):141。

Bomann, H. G. and Steiner, H. 1981 Humoral immunity in *Cecropia* pupae. in "Current Topics in Microbiology and Immunology, eds. Henle, W., et al." **94/95**: 75—91.

Hoffmann, D., Hultmark, D. and Bomann, H. G. 1981 Insect Immunity: *Galleria mellonella* and other Lepidoptera have cecropinlike factors active against gram-negative bacteria. *Insect Biochem.* 11 (5): 537—48.

Hultmark, D., Engtrom, A., Bennich, H., Kapur. R. and Bomann, H. G. 1982 Insect Immunity: Isolation and structure of cecropins D and four minor antibacterial components from cecropia pupae. *Eur. J. Biochem.* **127**: 207—17.

Liu, Xin-yan, et al. 1981 Mechanism of interferon action role of pppA 2′p5′A2′p5′A. in "The Biology of the interferon system, eds. Maeyer, E. De, et al. Elsevier/North Holland Biomedical Press.

Powning, R. F. and Dividson, W. J. 1973 Studies on insect bacteriolytic enzyme. I. Lysozyme in haemolymph of *Galleria mellonella* and *Bombyx mori. Comp. Biochem. Physiol.* **45** (B): 246—8.

Qu Xian-ming, Steiner, H., Engtrom, A., Bennich, H. and Bomann, H. G. 1982 Insect Immunity: Isolation and structure of cecropins B and D from pupae of the Chinese oak silk moth, *Antheraea pernyi. Eur. J. Biochem.*, **127**: 219—24.

Steiner, H., Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H. and Bomann, H. G. 1981 Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, **292** (5829): 669—48.

COMPARATIVE STUDIES ON ANTIBACTERIAL SUBSTANCES OF SILKWORMS AFTER *ESCHERICHIA COLI* INJECTION AND ULTRASONIC TREATMENT

QU XIAN-MING　QI GUO-RONG
(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica)

HUANG ZI-RAN
(Department of Sericulture, South China Agricultural College)

This papaer deals with the immunological response of three species of silkworms and the results are summarized as follows.

1. The pupae of *Antheraea pernyi, Philosamia cynthia ricini* and *Bombyx mori* could all be induced to producing antibacterial substances in the haemolymph by injection with *Escherichia coli* or treatment with ultrasonic waves. Both methods induced the pupae of the same species of silkworms to yield the same products, but different antibacterial spectra appeared in the different species.

2. Similar antibacterial substances were induced by *E. coli* at different developmental stages of *B. mori*. The ratios of antibacterial substances induced by *E. coli* in *B. mori* pupae were different in different sexes and the period of response was also different in the different strains of *B. mori*.

3. In addition to the common antibacterial protein bands, a product which was more basic and moved faster in electrophoresis (PAGE) than the others was induced by injection with poly I:C. Separation and identification of this new substance are now in progress.

All of our results indicate that the inducible antibacterial substances in the silkworms are nonspecific for the inducers and corresponding relationship cannot be found.

Key words *Bombyx mori—Philosamia cynthia ricini—Antheraea pernyi*—antibacterial substance—*Escherichia coli*—ultrasonic waves